

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-191384

(P2002-191384A)

(43) 公開日 平成14年7月9日 (2002.7.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	データベース* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 3

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2001-348017 (P2001-348017)	(71) 出願人	591003013 エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCH E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチ-4070バーゼル・グレンツアーヘルストラツセ124
(22) 出願日	平成13年11月13日 (2001. 11. 13)	(72) 発明者	ヴォルフガング ディートマイヤー ドイツ連邦共和国 デー-93049 レーゲ ンスブルク アンナホフシュトラーセ 27 エー
(31) 優先権主張番号	0 0 1 2 4 8 9 7. 0	(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(32) 優先日	平成12年11月15日 (2000. 11. 15)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (E P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 反復性PCR産物の融解曲線解析方法

(57) 【要約】

【課題】断片分離することなく迅速かつ簡便に反復構造の長さを解析する方法を提供すること。

【解決手段】 a) ①非反復領域に相補的な第1のセグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2のセグメントとを含有した少なくとも1種のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、②試料中の標的核酸とのハイブリダイゼーションを行なうステップ；及び b) 該標的核酸と該少なくとも1種のハイブリダイゼーションプローブとの間で形成されたハイブリッドの融解点温度を決定するステップを含む、反復配列と非反復配列とからなる標的核酸の解析方法；マイクロサテライトの解析のための該方法の使用；集団における個体の同定のための該方法の使用；非反復領域に相補的な第1のセグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2のセグメントとを含有してなるポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブ。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) ①非反復領域に相補的な第1のセグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2のセグメントとを含有した少なくとも1種のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、

②試料中の標的核酸とのハイブリダイゼーションを行なうステップ；及び

b) 該標的核酸と該少なくとも1種のハイブリダイゼーションプローブとの間で形成されたハイブリッドの融解点温度を決定するステップを含む、反復配列と非反復配列とからなる標的核酸の解析方法。

【請求項2】 a) ①非反復領域に相補的な第1のセグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2のセグメントとを含有した少なくとも1種のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、

②試料中の標的核酸とのハイブリダイゼーションを行なうステップ、

b) ステップa)と同じポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、参照試料における標的核酸とをハイブリダイズさせるステップ、

c) 試料と参照試料とにおいて、標的核酸と少なくとも1種のハイブリダイゼーションプローブとの間で形成されたハイブリッドの融解点温度を決定するステップ、並びに

d) 試料における標的核酸と参照試料における標的核酸との間の反復数の差異の基準として、前記の2つの融解点温度の差異を決定するステップを含む、試料中における反復配列と非反復配列とからなる標的核酸の解析方法。

【請求項3】 マイクロサテライトの解析のための、前記1又は2記載の方法の使用。

【請求項4】 非反復領域に相補的な第1のセグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2のセグメントとを含有してなるポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブ。

【請求項5】 第1のプローブが、非反復領域にハイブリダイズするプローブであり、第2のプローブが、請求項4記載のプローブである、FRETハイブリダイゼーションプローブのペア。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸ハイブリダイゼーション技術に関する。

【0002】

【従来の技術】分子生物学分野において、ハイブリダイゼーション技術がよく知られている。かかるハイブリダイゼーション技術によれば、特異的なハイブリダイゼーションプローブが使用できる場合、特異的な配列の検出

が可能になる。通常、前記ハイブリダイゼーションプローブは、検出可能な部分、例えば、放射活性標識、蛍光標識などにより標識される。

【0003】また、ポリメラーゼ チェーン リアクション（PCR）は、核酸の解析のための強力な、かつ広く行われた技術となっている。PCRの原理は、米国特許第4,683,195号明細書及び米国特許第4,683,102号明細書〔ムリス（Mullis）ら〕に開示されている。PCRにおける主要な改良点は、オンライン検出によりPCR時の反応のカイネティックスを測定する可能性から得られる。これは、蛍光モニターを介してアンプリコンを検出することにより、可能になっている。

【0004】一方、増幅反応の間にすでに存在する好適な蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブは、ついで、温度依存融解曲線解析を行なうために、反応容器を考慮しない均一系アッセイ（homogenous assay）に用いられうる。かかる解析のために、試料の温度を連続的に上昇させ、（増幅された）標的核酸とハイブリダイゼーションプローブとの間の先に生じたハイブリッド複合体が、解離する正確な融解温度を測定する。かかるアプローチは、1塩基多型により他と異なるにすぎない標的分子間の融解温度の差異を検出するために用いられうる。すなわち、融解曲線解析は、点変異の検出又は同定にも用いられうる。

【0005】かかる技術の例示は、国際公開第97/46707号パンフレット、国際公開第97/46712号パンフレット及び国際公開第97/46714号パンフレット〔ウィットワース（Wittwer）ら〕に詳細に開示されており、その教示は、参照により本明細書に取り込まれる。

【0006】つづく融解曲線解析に際する、PCR増幅産物の生成又は変異の同定を連続的にモニターしうる、標的依存蛍光シグナルの発生に基づくいくつかの検出様式が開示されている〔ウィットワース（Wittwer）ら、Biotechniques、第22巻、第1号、130-138、（1997）に概説されている〕。これらの検出様式としては、特に限定されないが、a)ハイブリダイゼーションにおける蛍光共鳴エネルギー転移の増加に基づく検出様式、及びb)分子ビーコンに基づく検出様式などが挙げられる。

【0007】前記a)の検出様式において、増幅産物の一方の鎖の隣接するがオーバーラップしていない領域にハイブリダイズしうる、蛍光部分で標識された2種のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブが用いられる。好ましくは、一方のオリゴヌクレオチドの5'末端を標識し、もう一方のオリゴヌクレオチドの3'末端を標識する。標的DNAにハイブリダイズする場合、2つの蛍光標識を、2つの蛍光部分の間の蛍光共鳴エネルギー転移が起こりうるように、近接に接触させ

る。結果として、ハイブリダイゼーションは、ドナー部分の励起、ついで別のアクセプター部分の蛍光発光の測定を介してモニターされる（国際公開第97/46714号パンフレット）。

【0008】同様の態様として、特異的FRETペアとしても働くであろう1つの適切に標識されたプライマーとともに、1つの蛍光標識プローブのみが用いられる〔バーナード (Bernard) ら、Anal. Biochem., 235, 101-107 (1998)〕。

【0009】前記b)の検出様式において、分子ビーコンオリゴヌクレオチドを、分子の2次構造により互いに近接している蛍光化合物と消光化合物とで標識する。標的DNAへの結合に際して、分子内水素結合が破壊され、プローブの一方の末端に結合した蛍光化合物が、該プローブの反対側の末端に結合した消光化合物から分離される〔リザーディ (Lizardi) ら、米国特許第5,118,801号明細書〕。

【0010】しかしながら、本発明がなされる前、反復配列における配列反復の数の定量を可能にする使用可能な均一系 (homogenous) の検出様式はなかった。それでもなお、かかる反復数の解析は、例えば、マイクロサテライト解析の分野において、重要である。

【0011】マイクロサテライト (MIS) は、全ヒトゲノムに散在する短い縦列配列である。マイクロサテライトは、統計的に、100,000塩基対毎に約1回見出される。現在までに、モノヌクレオチドリピート、ジヌクレオチドリピート、トリヌクレオチドリピート、テトラヌクレオチドリピート、又はペンタヌクレオチドリピートとしてその最も短い反復単位の長さで他と異なる5クラスのMISが、述べられている。通常、これらの反復単位は、縦列配列において、10~40回繰り返して起こる。同じ個体の正常DNAと腫瘍材料由来のDNAとを比較した場合、多くの腫瘍患者において、小さい欠失又は挿入の形でマイクロサテライト不安定性 (MIN) が検出される〔チボドー (Thibodeau) ら、Science, 260, 816-819 (1993)；国際公開第94/19492号パンフレット〕。これは、PCRによりDNAを増幅し、ついで、ゲル電気泳動により、増幅産物を分離することにより、達成される。腫瘍細胞の永続的な複製の欠損は、MINの原因であると見なされる〔パーソンズ (Parsons) ら、Cell, 75, 1227-1236 (1993)；シバタ (Shibata) ら、Nat. Genet., 6, 273-281 (1994)〕。かかる腫瘍は、『複製エラー陽性』 (RER+) として分類される。RER+表現形質は、HNPC (遺伝性非ポリプ性結腸癌；hereditary non-polyposis colon cancer) のファミリーの結腸直腸癌に特有である〔アールトネン (Aaltonen) ら、Science, 260, 812-816

(1993)〕。

【0012】マイクロサテライトの解析は、診断用途のため及びRER+腫瘍の腫瘍発生の判定のための非常に興味深い方法である。シーケンスする前に、MINの決定を行なうことは簡単であるため、HNPCファミリーのミスマッチ修復遺伝子は、潜在的なRER+患者を同定するに適した助けである。また、MINの発生は、よりよい予後に関連するため、MIN解析は、散发性結腸癌の予後診断に重要である〔ローテ (Lothe) ら、Cancer Res., 53, 5849-5852 (1993)；チボドー (Thibodeau) ら、Science, 260, 816-819 (1993)；バップ (Bubb) ら、Oncogene, 12, 2641-2649 (1996)〕。

【0013】MINは、散发性結腸癌においては、10~20%の頻度で生じるに過ぎない〔チボドー (Thibodeau) ら、Science, 260, 816-819 (1993)；イオノフ (Ionov) ら、Nature, 363, 558-561 (1993)；アールトネン (Aaltonen) ら、Science, 260, 812-816 (1993)；ローテ (Lothe) ら、Cancer Res., 53, 5849-5852 (1993)〕が、全HNPC腫瘍の90%を超える症例において、検出される〔リウ (Liu) ら、Nature Med., 2, 169-174 (1996)〕。しかしながら、MINは、結腸癌に限定されず、他の癌においても検出されており、特に、膵臓癌〔ハン (Han) ら、Cancer Res., 53, 5087-5089 (1993)〕、胃癌〔ハン (Han) ら、Cancer Res., 53, 5087-5089 (1993)；ペルトマキ (Peltomaki) ら、Cancer Res., 53, 5853-5855 (1993)；ミロノフ (Mironov) ら、Cancer Res., 54, 41-44 (1994)；リュウ (Rhyu) ら、Oncogene, 9, 29-32 (1994)；チョン (Chong) ら、Cancer Res., 54, 4595-4597 (1994)〕、精巣癌〔ガオ (Gao) ら、Oncogene, 9, 2999-3003 (1994)〕、子宮内膜腫〔ライジンジャー (Risinger) ら、Cancer Res., 53, 5100-5103 (1993)；ペルトマキ (Peltomaki) ら、Cancer Res., 53, 5853-5855 (1993)〕、乳癌〔ペーテル (Patel) ら、Oncogene, 9, 3695-3700 (1994)〕などが挙げられる。

【0014】従来、マイクロサテライトの解析は、増幅産物の大きさを検出し、それにより反復構造の長さについての情報を得るために、いかなる場合のゲル電気泳動による断片分離にも時間がかかっていた。

【0015】したがって、当該技術分野において、断片分離することなく、反復構造の長さを解析する方法を提供することが望まれている。かかる方法は、迅速かつ簡便に行ないということが要求されている。また、かかる方法が、原理的に自動化されうる場合、有利である。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、断片分離することなく、反復構造の長さを解析する方法を提供することを目的とする。さらに、本発明は、断片分離することなく、迅速かつ簡便に、反復構造の長さを解析する方法を提供することを目的とする。

【0017】

【課題を解決するための手段】本発明は、試料中に存在する反復配列の数を、融解温度解析により決定する方法に関する。

【0018】したがって、第1の概念において、本発明は、a) ①非反復領域に相補的な第1セグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2セグメントとを含有した少なくとも1種のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、②試料中の標的核酸とのハイブリダイゼーションを行なうステップ、及び

b) 標的核酸と該少なくとも1種のハイブリダイゼーションプローブとの間に形成されたハイブリッドの融解点温度を決定するステップを含む、反復配列と非反復配列とからなる標的核酸の解析方法に関する。

【0019】本発明によれば、融解点温度は、標的核酸に存在する反復の数に相関しうる。

【0020】通常、決定された融解温度値と、参照核酸について得られた融解温度値とを比較することが有利である。したがって、本発明は、

a) ①非反復領域に相補的な第1セグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2セグメントとを含有した少なくとも1種のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、②試料中の標的核酸とのハイブリダイゼーションを行なうステップ、

b) ステップa) と同じポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、参照試料における標的核酸とをハイブリダイズさせるステップ、

c) 試料と参照試料とにおいて、標的核酸と少なくとも1種のハイブリダイゼーションプローブとの間で形成されたハイブリッドの融解点温度を決定するステップ、並びに

d) 試料における標的核酸と参照試料における標的核酸との間の反復数の差異の基準として、前記試料及び参照試料のそれぞれにおける融解点温度の差異を決定するステップを含む、試料中における反復配列と非反復配列とからなる標的核酸の解析方法に関する。

【0021】感度を増加させるために、ハイブリダイゼ

ーション前に、標的核酸を増幅する場合、有利であることがわかっている。増幅は、例えば、ポリメラーゼチェーンリアクションにより、容易に達成されうる。

【0022】通常、少なくとも1種のハイブリダイゼーションプローブが標識される。ここで、標識は、好ましくはフルオロフォア (fluorophore) である。よりさらに好ましい態様において、FRET/Hyb probe による検出原理が行なわれる。この場合において、両方のプローブが標的核酸にハイブリダイズされる場合、蛍光共鳴エネルギー転移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer) が起こりうるような異なるフルオロフォアで標識された隣接的にハイブリダイズする2つのプローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行なう。

【0023】新規な方法が、反復配列における反復構造の数が決定される必要がある多くの異なる実験計画に応用できる。

【0024】結果として、本発明の特定の概念は、マイクロサテライト、特にマイクロサテライト不安定性 (Microsatellite Instability; MIN) の新規な解析方法の応用に関する。かかる解析は、遺伝性の腫瘍、特に、HNPCC ミスマッチ修復遺伝子の欠損により引き起こされる結腸癌を検出するために、よく応用されうる。

【0025】同様に、本発明の他の概念は、例えば、法医学問題の解決のために、本発明の新規な方法の、集団における個体の同定のための使用に焦点があてられる。

【0026】さらなる概念において、さらに、本発明は、非反復領域に相補的な第1セグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2セグメントとを含有した各ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブに関する。本発明の特定の態様において、プローブに存在する反復の数は、野生型の標的配列における反復の数と同一である。特定の野生型がない場合、プローブ内の反復の数は、調査対象の反復遺伝子座に見出される反復の最大数と好ましくは同一である。

【0027】さらに、本発明は、かかるハイブリダイゼーションプローブの非反復セグメントが、3-10ヌクレオチド長、よりさらに好ましくは、3、4、5又は6ヌクレオチド長である場合、おおいに有利であることがわかっている。

【0028】他の概念において、本発明は、第1のプローブが、非反復性配列からなり、第2のプローブが、非反復性領域と、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2のセグメントとを含有する、FRETハイブリダイゼーションプローブのペアに関する。

【0029】さらなる概念において、本発明は、上記に開示されたプローブ特性に従ったBAT26の解析のた

めの配列番号：4の配列を有する特異的ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブ及びB A T 2 5の解析のための配列番号：7の配列を有する特異的ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブに関する。

【0030】すなわち、本発明は、

〔1〕 a) ①非反復領域に相補的な第1のセグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2のセグメントとを含有した少なくとも1種のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、②試料中の標的核酸とのハイブリダイゼーションを行なうステップ；及び

b) 該標的核酸と該少なくとも1種のハイブリダイゼーションプローブとの間で形成されたハイブリッドの融解点温度を決定するステップを含む、反復配列と非反復配列とからなる標的核酸の解析方法、

〔2〕 融解点温度が、標的核酸に存在する反復の数と相關する、前記〔1〕記載の方法、

〔3〕 a) ①非反復領域に相補的な第1のセグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2のセグメントとを含有した少なくとも1種のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、②試料中の標的核酸とのハイブリダイゼーションを行なうステップ、

b) ステップa)と同じポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、参照試料における標的核酸とをハイブリダイズさせるステップ、

c) 試料と参照試料とにおいて、標的核酸と少なくとも1種のハイブリダイゼーションプローブとの間で形成されたハイブリッドの融解点温度を決定するステップ、並びに

d) 試料における標的核酸と参照試料における標的核酸との間の反復数の差異の基準として、前記の2つの融解点温度の差異を決定するステップを含む、試料中における反復配列と非反復配列とからなる標的核酸の解析方法、

〔4〕 ハイブリダイゼーション前に、標的核酸を増幅する、前記〔1〕～〔3〕いずれか1項に記載の方法、

〔5〕 少なくとも1種のハイブリダイゼーションプローブが、標識されたプローブであり、標識が、好ましくは、フルオロフォアである、前記〔1〕～〔4〕いずれか1項に記載の方法、

〔6〕 異なるフルオロフォアでそれぞれ標識された2種の隣接してハイブリダイズするプローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行ない、ここで、両方のプローブが標的核酸にハイブリダイズされる場合、蛍光共鳴エネルギー転移が起こりうる、前記〔5〕記載の方法、

〔7〕 非反復領域と、隣接反復領域に相補的な第2のセグメントとを含有したプローブのフルオロフォアが、プローブの非反復領域に結合されたものである、前記〔6〕記載の方法、

〔8〕 マイクロサテライト、特にマイクロサテライト不安定性の解析のための、前記〔1〕～〔7〕いずれか1項に記載の方法の使用、

〔9〕 遺伝性腫瘍の検出の手段としての、前記〔8〕記載の使用、

〔10〕 集団における個体の同定のための、前記

〔1〕～〔7〕いずれか1項に記載の方法の使用、

〔11〕 非反復領域に相補的な第1のセグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2のセグメントとを含有してなるポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブ、

〔12〕 反復の数が、野生型の標的配列の反復の数と同一又は特定の反復遺伝子座に存在する反復の最大数と同一である、前記〔11〕記載のハイブリダイゼーションプローブ、

〔13〕 非反復セグメントの長さが、3～10ヌクレオチド長、好ましくは、4～6ヌクレオチド長である、前記〔11〕又は〔12〕記載のハイブリダイゼーションプローブ、

〔14〕 第1のプローブが、非反復領域にハイブリダイズするプローブであり、第2のプローブが、前記〔11〕～〔13〕いずれか1項に記載のプローブである、FRETハイブリダイゼーションプローブのペア、

〔15〕 第2のプローブの標識が、該プローブの非反復領域に結合されたものである、前記〔14〕記載のFRETハイブリダイゼーションプローブのペア、並びに、

〔16〕 配列番号：4又は配列番号：7の配列を有してなる、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブ、に関する。

【0031】

【発明の実施の形態】本明細書において、下記用語が、さらに定義される必要がある。

【0032】本明細書における『反復』は、DNAのより長い断片若しくは時々RNA分子においても何回も見出される短い核酸配列である。1つの反復において、ヌクレオチド塩基は、常に同じ順番で存在する。これらの反復は、ゲノムの利己的、非コード領域にしばしば見出される。多くの場合、これらの反復構造は、マイクロサテライトと称される。

【0033】1つの反復を生じるヌクレオチドの数は、変化してもよい。モノヌクレオチド反復は、1種類のヌクレオチド塩基、すなわち、A、G、C又はTからなり、モノヌクレオチドのストレッチをもたらす。ジヌクレオチド反復は、2つのタイプのヌクレオチド塩基、例えば、CAなどからなり、交互の配列、すなわち、(CA) n のストレッチをもたらす。3ヌクレオチド反復、4ヌクレオチド反復及び5ヌクレオチド反復も、しばしば観察されている。本明細書において、 n -ヌクレオチド反復は、長さ n (n は、1～10、好ましくは、1～

5、最も好ましくは、1又は2ヌクレオチドである)を有する反復を含有する反復構造であると理解される。

【0034】反復配列は、連続した配列又は逆方向配列で存在する複数の反復を有する配列である。ある場合、反復配列は、特有の(unique)非反復配列により中断されていてもよい。また、複数のタイプの反復、とくに複数のタイプのモノヌクレオチド反復を含む反復配列が同定されている。

【0035】ハイブリダイゼーションプローブは、標的核酸の配列と完全に同一又は厳密に相補的な配列を有するポリヌクレオチドである。なお、前記プローブが1若しくは複数のミスマッチを含む場合、該プローブが、適切なハイブリダイゼーション条件下において、分析対象物にハイブリダイズしうるものであれば、本発明の範囲に含まれる。いかなる場合においても、配列同一性又は相補性が少なくとも10個の隣接する残基の範囲にわたって100%である場合、特に有利であることがわかる。また、プローブの長さが、100ヌクレオチド以下、好ましくは40ヌクレオチド以下である場合、有利であることがわかる。

【0036】しかしながら、特に本明細書においては、ハイブリダイゼーションプローブは、標的核酸にハイブリダイズしない5'突出部分又は3'突出部分を有してもよい。すなわち、本発明は、標的核酸に存在する反復の数を検出する方法に関するもので、プローブにおける反復の数が、標的核酸に予期されうる反復の最大数と同一であることを必要とする。

【0037】ハイブリダイゼーションプローブは、ハイブリダイゼーションの結果を当該技術分野に公知の方法で検出できるように、検出可能な部分(entity)、例えば、蛍光化合物などを結合させてもよい。

【0038】「FRETハイブリダイゼーションプローブ」は、両方のプローブが、標的分子に隣接してハイブリダイズする場合、ともにFRETペアとして働き、それにより、核酸の検出を可能する、蛍光化合物をそれぞれ保持するハイブリダイゼーションプローブのペアとして定義される。

【0039】「ポリヌクレオチド」は、(デオキシ)ーオリゴーリボヌクレオチドだけでなく、当該技術分野に公知の全てのDNA誘導体又はRNA誘導体、例えば、メチルホスホネート；ホスホチオエート；2'-O-アルキル誘導体並びにペプチド核酸；7-デアザプリンなどの修飾塩基を含有したアナログなどに要約される。

【0040】ハイブリダイゼーションプローブと標的核酸とのハイブリダイゼーション後、本発明によれば、融解点温度の決定が行なわれる。融解点温度は、標的/プローブハイブリッドの2本鎖領域のサイズに優先的に依存する。反復配列を含有するハイブリダイゼーションプローブを用いる場合、ハイブリダイゼーション温度は、標的DNAに存在する反復の数に依存し、相関しうる。

【0041】また、融解温度は、①二本鎖領域のGC含量、②二本鎖領域内のミスマッチの有無、及び③例えば、試料の塩濃度などの比較的重要性の低い他の因子、に依存することが当該技術分野に公知であり、無視すべきではない。

【0042】融解点温度は、通常、試料を、温度の構成的な上昇に供し、続いて、ハイブリダイゼーション複合体の一本鎖への解離を測定することにより、実験的に決定される。解離は、例えば、UV吸収のシフト、表面プラズモン共鳴、又は好ましくは蛍光などの種々の方法により、検出されうる。蛍光により検出される場合、ハイブリダイゼーションプローブは、通常、蛍光部分で標識され、蛍光シグナルの生成は、ハイブリダイゼーション複合体の形成になんらかの形で依存する。なお、本明細書において、温度の構成的な上昇とは、直線的で中断されない温度の上昇をいう。

【0043】好ましい態様において、アッセイは、均一系の検出様式で行なわれる。例えば、標的核酸は、融解温度決定に先立ち、適切な増幅プライマーによる典型的なPCRの反応で増幅してもよい。適切なハイブリダイゼーションプローブは、既に増幅反応の際に存在する。ハイブリダイゼーションプローブは、好ましくは、適当な励起後に検出できる蛍光標識を担持する。例えば、ハイブリダイゼーションプローブは、好ましくは、分子ビーコン[リザーディ(Lizardi)ら、米国特許第5,118,801号明細書]又はFRET-Hybridation様式[国際公開第97/46714号明細書]に従いともに働きうる蛍光標識されたオリゴヌクレオチドの対のいずれであってもよい。PCRの反応終了後、試料の温度を、構成的に上昇させる。ハイブリダイゼーションプローブが標的DNAに結合されるものであれば、蛍光が検出されうる。しかしながら、融解温度において、ハイブリダイゼーションプローブは、その標的から解離し、蛍光シグナルがバックグラウンドレベルにまで、直ちに減少する。この減少は、温度低下が観察される正確な温度値を決定しうるように、適切な温度-時間プロットでモニターされる。

【0044】本発明のハイブリダイゼーションプローブの設計には、いくつかの前提条件が要求される。

【0045】第1に、プローブは、該プローブの5'末端又は3'末端のいずれかに局在する非反復ハイブリダイズセグメントを含有しなければならない。非反復セグメントの長さは、特定のアッセイ条件に依存して変化してもよい。通常、標的配列にハイブリダイズする少なくとも3ヌクレオチドのセグメントが、十分であることがわかっている。かかる非反復ハイブリダイズ配列の存在は、標的配列における同一の反復の数と無関係である長所を有し、プローブは、いつも非反復領域と反復配列からなる領域との間のトランジションである標的核酸の決められた位置に正確にハイブリダイズするであろう。

【0046】第2に、標的核酸の配列に存在する反復が伸びるプローブに存在する反復の数は、非常に重要である。より具体的には、本発明の方法に用いられたn反復を含むハイブリダイゼーションプローブは、0～n間の数の反復を含むいくつかの標的核酸間を識別することができるであろう。対照的に、決定された融解点温度は、n反復又はnを超える数の反復を含む全ての標的核酸と等しいであろう。

【0047】第3に、ハイブリダイゼーションプローブに存在する反復の数は、融解点温度解析に用いられうるハイブリダイゼーションプローブの長さが限定されるという事実により限定される。本明細書において、ハイブリダイゼーションプローブの全体の長さが、100ヌクレオチド以下、好ましくは、80ヌクレオチド以下、最も好ましくは、60ヌクレオチド以下である場合、有利であることがわかっている。

【0048】図1は、一方のハイブリダイゼーションプローブを適用する場合に用いてもよい2つの異なるプローブデザインを示す。これは、いかなる不均一なアッセイ様式であってもよく、蛍光部分が、プローブの5'末端若しくは3'末端のいずれかに結合又は近接し、消光部分が、プローブの逆の末端に結合若しくは近接する、別に均一系の分子ビーコン様式を用いる場合であってもよい。

【0049】ある場合、本発明のプローブは、内部の反復セグメントにより連結された5'末端及び3'末端の2つの非反復セグメントからなっていてさえもよい。

【0050】プローブは、その5'末端又は3'末端における反復領域に直接に隣接して局在する、標的配列における一方の非反復(unique)領域に相補的な非反復部分を含有する。ハイブリダイゼーションプローブよりも少ない反復を含む標的分子とのハイブリダイゼーションの結果の場合、ハイブリダイゼーションプローブにおける反復の数と標的配列における反復の数とが等しい状態と比較して、プローブの一本鎖突出部分が生じ、融解温度が減少する。より一般的には、融解温度は、標的に存在する反復の数に直接依存する、すなわち、試料により多くの反復が存在すればするほど、融解温度が一層高くなる。

【0051】図2は、3つの異なるFRET Hybrid probeデザインを示すが、本発明の範囲を限定するものではない。かかるプローブデザインについて、FRETプロセスは、あるプローブが、標的分子から解離するやいなや、中断されるので、反復領域を含有する第2のプローブは、反復配列を含まないプローブの融解温度と比較して、より高い融解温度を有することが必要である。

【0052】図2Aは、第1のハイブリダイゼーションプローブが、独占的に、解析対象の反復領域の近接に接触した上流の領域に相補的な非反復配列からなる、ハイ

ブリダイゼーションプローブのペアを開示する。蛍光標識は、プローブの3'末端に付加される。第2のプローブは、本発明によりデザインされ、非反復配列に相補的な第1の配列と標的核酸の反復配列に相補的な第2の配列とを有する。このプローブは、その5'末端において蛍光標識を保持し、両方のプローブを標的分子にハイブリダイズする場合、第1のプローブの標識に近接して接触する。

【0053】一方、独占的に非反復配列からなるプローブが、その5'末端に標識を保持し、反復領域の下流にハイブリダイズするが、本発明によりデザインされた第2プローブがその3'末端において標識されている態様も本発明の範囲内である。

【0054】図2Bは、本発明のプローブデザインの別のアプローチを示す。ここで、反復配列と非反復配列との両方を含むプローブの蛍光標識は、プローブの反復セグメントに付加される。相補的なハイブリダイゼーションプローブよりも反復がより少ない標的分子とのハイブリダイゼーションの場合、融解温度が減少するように、該プローブ内にループを生じるであろう。

【0055】また、本発明によりデザインされた2ペアのハイブリダイゼーションプローブを用いることもできる。ハイブリダイゼーションの結果に続く融解温度解析の際、2つの顕著な融解温度が観察され、ついで、標的に存在する反復の数が、両方の決定された融解温度を考慮して算出されうる。

【0056】図2Cは、本発明の範囲内のさらなる別法を開示する。両方のプローブは、非反復領域に相補的な第1セグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復からなる第2セグメントとを含有する。ついで、2つの蛍光標識を2つのプローブの反復領域内に付加する。この特定の場合、両方のプローブに存在する反復の数は、共に解析対象の標的核酸に期待されるであろう反復の最大数に対応する。さらに、標的核酸に存在する反復が、より少ない場合、ハイブリダイゼーションプローブ内にループ構造が、形成され、融解温度が低下する。

【0057】反復配列にハイブリダイズする2つのプローブが用いられるので、さらには、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブの最大長が、慣用のオリゴヌクレオチド合成化学法的能力により限定されるため、本発明の本態様は、非常に長い反復構造の解析に特に有益である。しかしながら、目的の反復遺伝子座と、それとは異なるゲノムの遺伝子座とが同じタイプの反復からなる場合、これらのプローブは、目的の反復遺伝子座とは異なるゲノムの遺伝子座に共に結合するであろうため、かかるプローブデザインは、特異性の減少をもたらすであろう。

【0058】本発明は、反復配列の解析、特に、マイクロサテライト反復の解析のための多様な用途に適する。

例えば、本発明のマイクロサテライト反復解析は、癌抑制遺伝子のゲノム不安定性の指標として、異型接合性の欠損を評価して、そうして、いくつかのタイプの腫瘍の指標とするのに適用されうる〔クヌッドソン (Knudson), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90, 10914-10921頁 (1993)〕。

【0059】特に、新規な発明は、ミスマッチ修復遺伝子における変異の指標であり、そのため、遺伝性非ポリープ性結腸癌 (HNPCC) の指標となることが知られているマイクロサテライト不安定性〔ペルトマキ (Peltonen-Maki) ら, Science 260, 810-812頁 (1993)〕の解析に応用されうる。また、例えば、小細胞肺癌などの他のタイプの癌も事前診断することができる。

【0060】最後に、本発明は、個人認識、組織タイピング及び集団遺伝子解析を含むあらゆるタイプの集団研究及び法医学用途〔ケス (Koeth) ら, J. Path., 178, 239-248頁 (1996)〕に一般的に応用可能である。

【0061】

【実施例】以下の実施例、参考文献、配列表及び図面は、本発明の理解を助けるために提供され、その本来の範囲は、添付の請求項に示される。本発明の意図を逸脱することなく、示された手順において改変が成されうる事が理解される。

【0062】実施例1 試料材料及び調製

70症例のマイクロサテライト安定性 (MSS) 腫瘍及び8症例のマイクロサテライト不安定 MSI-H 腫瘍 ($\geq 20\%$ 不安定性マーカー, 高MSI) を、モノヌクレオチド反復遺伝子座BAT25及びBAT26によるLightCyclerマイクロサテライト融解点解析に用いた。これらのマーカーは、MSI検出の最も高感度なマーカーとして述べられている〔ホアン (Hoang) ら, Cancer Res., (1997); デットマイヤー (Dietmaier) ら, Cancer Res., (1997); クラボ (Cravo) ら, J. Pathol (1999)〕。LightCycler解析のために、ホルマリン固定パラフィン包埋組織の5 μ m切片から、レーザー支援マイクロディセクション〔PALM社製, バーンリエト, ドイツ〕又はマニュアルマイクロディセクションにより、腫瘍組織領域及び正常組織領域をマイクロディセクトした。マイクロディセクトした組織由来のDNAをHigh Pure PCR Preparation Kit (ロッシュ社製) により調製した。

【0063】実施例2 BAT26のリアルタイムPCR
2 μ l DNA (50~200ng) を、最終濃度3mM MgCl₂、各0.5 μ MのBAT26-Upst

ream増幅プライマー (配列番号: 1; tgacta ctt t tg act tca gcc) 及びBAT26-Downstream増幅プライマー (配列番号: 2; aac cat tca aca ttt tta acc)、3'末端をフルオレセインで標識した0.15 μ M BAT26-ドナー-ハイブリダイゼーションプローブ (配列番号: 3; gca gca gtc aga gcc ctt aac ct)、5'末端をLightCycler fluorescent dye LC-Red-640 (ロシュモレキュラーバイオケミカルズ社製) で0.15 μ M BAT26-アクセプター-ハイブリダイゼーションプローブ (配列番号: 4; tca ggt aaa aaa aaa aaa aaa aa) 及び1 \times LightCyclerTM DNA Master Hybridization Probes-Mix (ロシュモレキュラーバイオケミカルズ社製) をもたらす13 μ lの増幅混合物と混合した。

【0064】LightCycler (ロシュモレキュラーバイオケミカルズ社製) を、続くリアルタイムPCR増幅のモニターに用いた。BAT26 PCR増幅プログラムを、95℃90秒で1回の変性ステップで開始し、シグナル検出のために、95℃/0秒-60℃/10秒-50℃/3秒の50サイクルを行ない、ついで、72℃/10秒を行なった。その後、95℃/0秒、35℃/30秒でアンプリコンをインキュベートし、連続的な管F2検出をしながら、0.2℃/秒ずつ95℃まで温度を上昇させることにより融解プロファイルを行なった。

【0065】リアルタイムPCRによるBAT26の増幅及び検出並びに融解点解析は、125/153 (82%) 及び26/31 (83%) ホルマリン固定パラフィン包埋組織試料のそれぞれにおいて実行可能である。BAT26融解点解析は、正常組織、血液、又はMSS腫瘍について、51-51.8℃の融解温度 (T_m) を表わした (図3A)。対照的に、hMSH2タンパク質発現又はhMLH1タンパク質発現を欠損する7種のMSI-H腫瘍のそれぞれ並びに100%のMSI割合は、43~46℃の範囲でT_m値が変化することを示した (図3B)。

【0066】実施例3 BAT25のリアルタイムPCR

示されたものを除いて、実施例2のように、増幅及び融解曲線解析を行なった。

【0067】各0.5 μ MのBAT25-Upstreamプライマー (配列番号: 5; tcg cct cca aga atg taa gt) 及びBAT25-Downstreamプライマー (配列番号: 6; tct gca ttt taa cta tgg ctc)、3'末端をフルオレセインで標識した0.15 μ M BAT25-ドナー-ハイブリダイゼーションプローブ (配列番号: 7; caa aaa aaa aaa aaa aaa aa a aat ca)、5'末端をLightCycler fl

uorescent dye LC-Red-705
(ロシモレキユラーバイオケミカルズ社製)で標識した0.15 μ M BAT25-アクセプター-ハイブリダイゼーションプローブ(配列番号:8;aacaaaacaacaaacaccttagagaaac)を、BAT25 LightCycler増幅に用いた。

【0068】BAT25増幅プログラムは、95℃90秒の1回の変性ステップ及びシグナル検出のための95℃/0秒-60℃/10秒の50サイクル、及び72℃/10秒を含んだ。95℃/0秒、35℃/30秒でアンプリコンをインキュベートし、連続的なF3検出をしながら0.2℃/秒ずつ95℃まで温度を上昇させることにより融解プロファイルを行なった。結果を図4に示す。BAT25の融解点解析は、正常組織及びMS S腫瘍DNAにおいて、44.5℃のT_m値を示した(図4A)が、2つのMS I-H腫瘍のBAT25-T_m値は、有意に低く42℃であった(図4B)。

【0069】実施例4 BAT26及びBAT25のリアルタイムデュプレックスPCR
1つのチューブ内でBAT25とBAT26とを解析す

るためのデュプレックス-PCRに関して、プライマーと、配列番号:1~8のBAT25及びBAT26の両方のFRET-ハイブリダイゼーションプローブとを実施例2及び3に示された濃度で合わせた。

【0070】LightCycler増幅プログラムは以下のとおりである:95℃90秒の1回の変性ステップ及びシグナル検出のための95℃/0秒-60℃/10秒-45℃/2秒の50サイクル、及び72℃/10秒。デュプレックス融解曲線プログラムは、:95℃/0秒、30℃/30秒及びF2とF3における連続的な蛍光検出を用いて、0.2℃/秒ずつ95℃までの温度上昇であった。

【0071】BAT25及びBAT26のデュプレックスLightCycler増幅を行なった場合、BAT25及びBAT26の別のLightCycler解析に比べてより高いT_m値が得られた(図5)。BAT25に関して、T_mの差異は、4℃であった(図5A)。BAT26のT_m値は、1℃高かった(図5B)。

【0072】
【表1】

参考文献のリスト

- Aaltonen ら、(1993), Science, 260, 812-816
Bernard ら、Analytical Biochemistry 235, p. 101-107 (1998)
Bubb ら、(1996) Oncogene, 12, 2641-2649
Chong ら、(1994) Cancer Res., 54, 4595-4597
Cravo ら、1999, J Pathol
Dietmaier ら、1997, Cancer Res.
Gao ら、(1994) Oncogene, 9, 2999-3003
Han ら、(1993) Cancer Res., 53, 5087-5089
Hoang ら、1997, Cancer Res.
Ionov ら、(1993), Nature, 363, 558-561
Knudson, Proc. Natl. Acad. Sci. US 90, p 10914-10921, 1993
Koeth ら、J. of Path. 178, p. 239-248, 1996
Liu ら、(1996) Nature Med., 2, 169-174
Lizardi ら、米国特許第 5,118,801 号明細書
Lothe ら、(1993) Cancer Res., 53, 5849-5852
Mironov ら、(1994) Cancer Res., 54, 41-44
Parsons ら、(1993), Cell, 75, 1227-1236
Patel ら、(1994) Oncogene, 9, 3695-3700
Peltomaki ら、(1993) Cancer Res., 53, 5853-5855
Peltomaki ら、Science 260, p 810-812, 1993
Rhyu ら、(1994) Oncogene, 9, 29-32
Risinger ら、(1993) Cancer Res., 53, 5100-5103
Shibata ら、(1994) Nat. Genet. 6, 273-281
Thibodeau ら、(1993) Science, 260, 816-819
Wittwer ら、Biotechniques, Vol. 22, No, 1, 130-138, 1997

【0073】

【発明の効果】本発明の反復配列と非反復配列とからな

る標的核酸の解析方法によれば、ゲル電気泳動による断片分離を行なうことなく、迅速かつ簡便に標的核酸を解

析することができるという優れた効果を奏する。また、
本発明のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプロ
ープによれば、非常に長い反復構造の解析が可能になる

という優れた効果を奏する。

【0074】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<;110>; F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
<;120>; Method for melting curve analysis of repetitive PCR products
<;130>; ROC-01-009
<;150>; EP 00 124 897.0
<;151>; 2000-11-15
<;160>; 8
<;170>; PatentIn Ver. 2.1
<;210>; 1
<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 1
tgactacttt tgacttcagc c 21

【0075】

<;210>; 2
<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 2
aaccattcaa catttttaac c 21

【0076】

<;210>; 3
<;211>; 23
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 3
gcagcagtc gagcccttaa cct 23

【0077】

<;210>; 4
<;211>; 30
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 4
tcaggtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 30

【0078】

<;210>; 5
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 5
tcgcctccaa gaatgtaagt 20

【0079】

<;210>; 6
<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens

```

<;400>; 6
tctgcatttt aactatggct c

```

21

【0080】

```

<;210>; 7
<;211>; 29
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 7
caaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaatca

```

29

【0081】

```

<;210>; 8
<;211>; 28
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 8
aacaaaacac aaaactcttt agagaatc

```

28

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のハイブリダイゼーションプローブの概略図を示す。反復は、矢印で示される。

【図2】図2は、本発明のFRETハイブリダイゼーションプローブの概略図を示す。反復は、矢印で示される。

【図3】図3は、本発明のモノヌクレオチド反復遺伝子

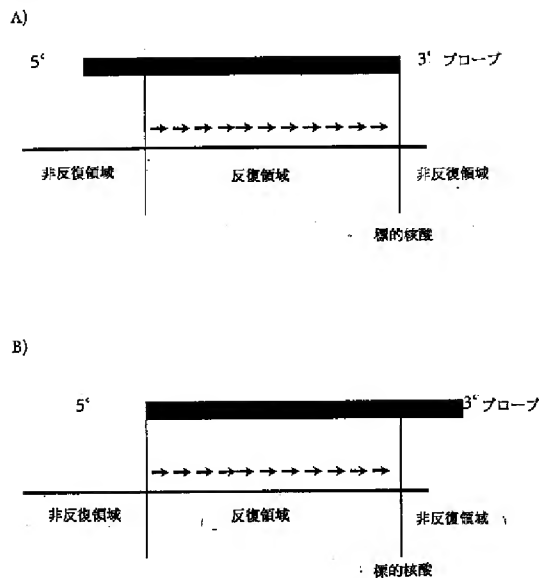
座BAT26のマイクロサテライト解析の結果を示す。

【図4】図4は、本発明のモノヌクレオチド反復遺伝子座BAT25のマイクロサテライト解析の結果を示す。

【図5】図5は、本発明のモノヌクレオチド反復遺伝子座BAT25及びBAT26のマルチプレックスマイクロサテライト解析の結果を示す。

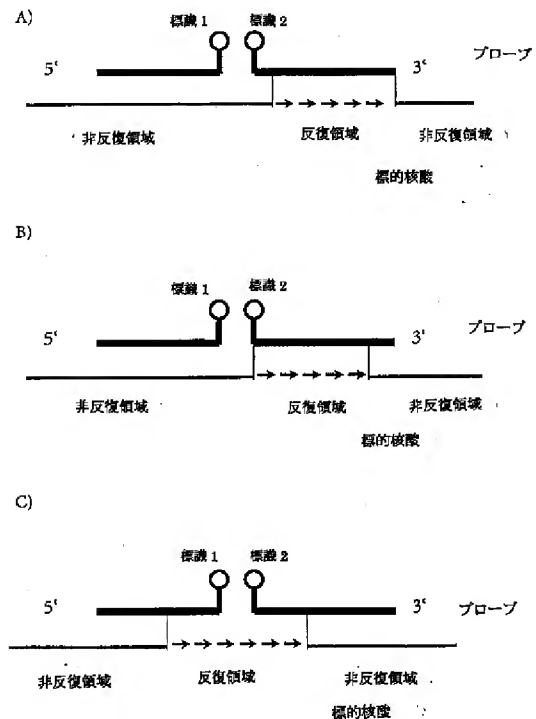
【図1】

Fig. 1



【図2】

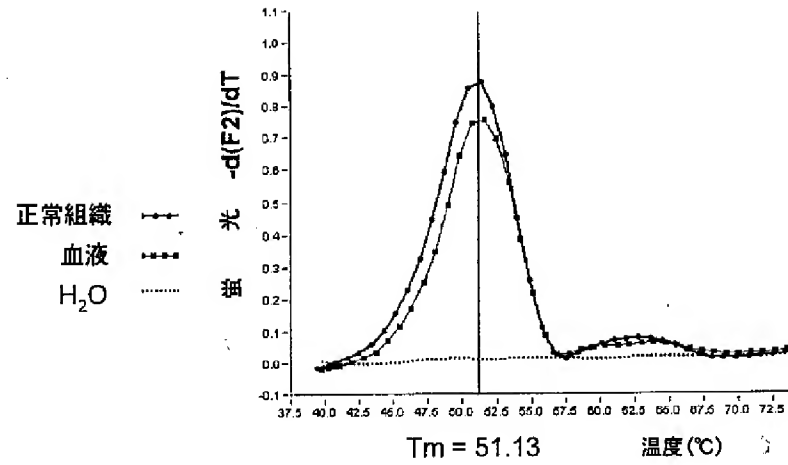
Fig. 2



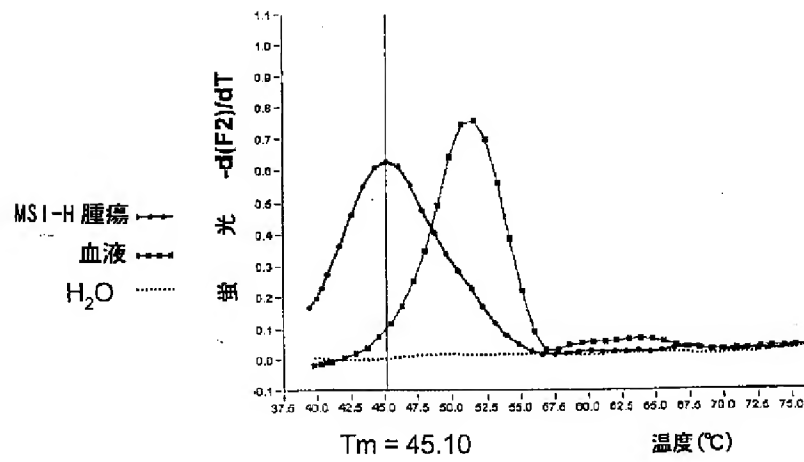
【図3】

Fig. 3 BAT 26

A)



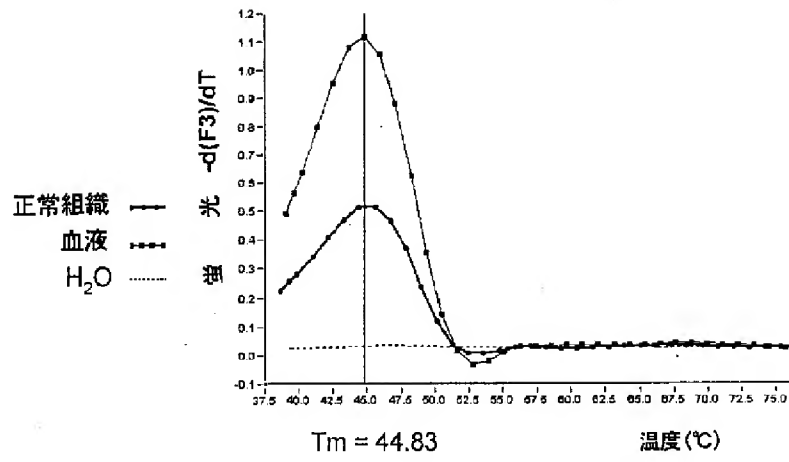
B)



【図 4】

Fig. 4 BAT25

A)



B)

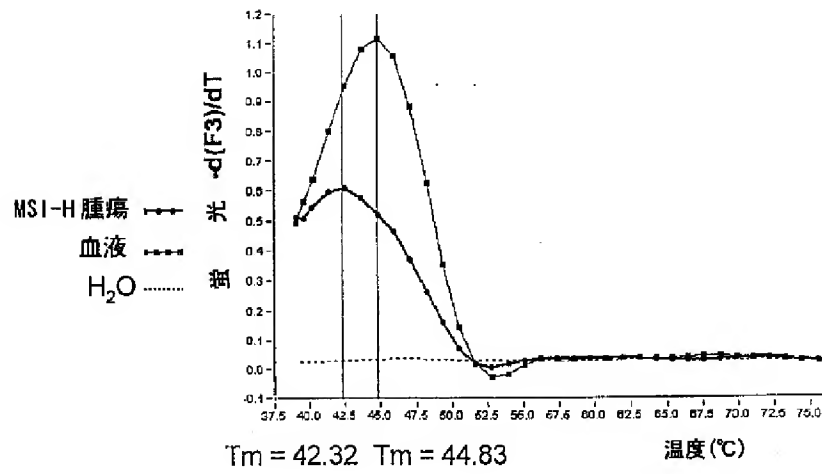
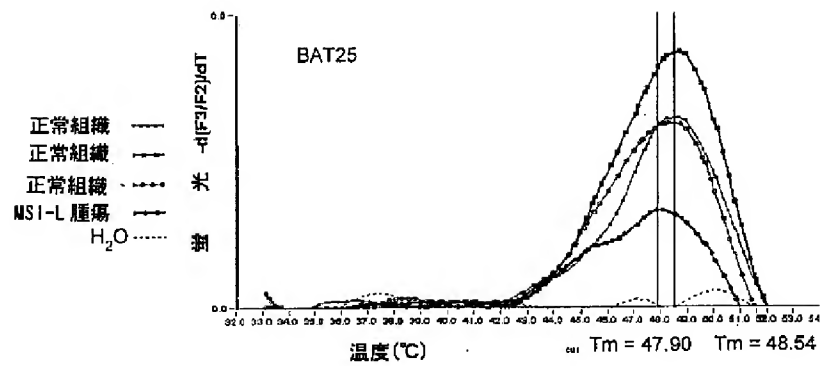
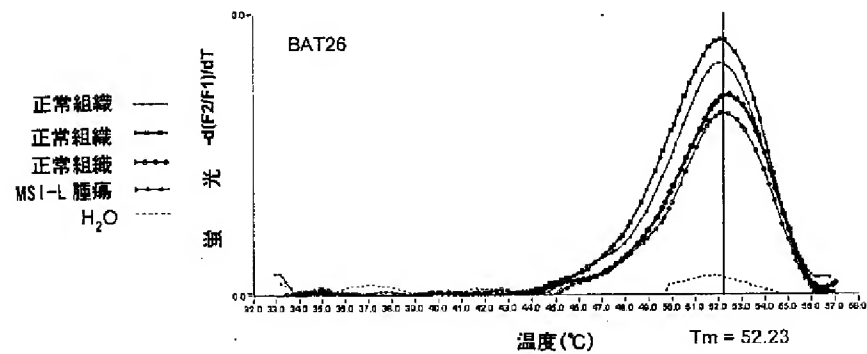


Fig. 5 デュプレックス-PCR

A)



B)



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA09 HA14 HA19
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ57 QR08
QR62 QS25 QS34

*** NOTICES ***

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] An analyzing method of target nucleic acid characterized by comprising the following.

a). The 1st segment complementary to ** non repetitive region

At least one sort of polynucleotide hybridization probes containing the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary and was provided in an adjacent repetitive region.

** A reiterative sequence and a unique sequence containing a step which determines melting point temperature of a hybrid in which step; which performs hybridization with target nucleic acid in a sample and b this target nucleic acid, and this few **** were formed among one sort of hybridization probes.

[Claim 2] An analyzing method of target nucleic acid characterized by comprising the following.

a). The 1st segment complementary to ** non repetitive region

At least one sort of polynucleotide hybridization probes containing the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary and was provided in an adjacent repetitive region.

** The same polynucleotide hybridization probe as a step which performs hybridization with target nucleic acid in a sample, and the b step a.

In a step and c sample which make target nucleic acid in a reference sample hybridize, and a reference sample, A step which determines melting point temperature of a hybrid formed between target nucleic acid and at least one sort of hybridization probes, And a reiterative sequence and a unique sequence in a sample containing a step which determines a difference between the two aforementioned melting point temperature as a standard of a difference in the number of replications between target nucleic acid in d sample, and target nucleic acid in a reference sample.

[Claim 3] Said 1 for analysis of a Microsatellite, or use of a method given in 2.

[Claim 4] A polynucleotide hybridization probe containing the 1st segment complementary to a non repetitive region, and the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary and was provided in an adjacent repetitive region.

[Claim 5] A pair of a FRET hybridization probe whose 1st probe is a probe hybridized to a non repetitive region and whose 2nd probe is the probe according to claim 4.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]Drawing 1 shows the schematic diagram of the hybridization probe of this invention. Repeatedly, it is shown by the arrow.

[Drawing 2]Drawing 2 shows the schematic diagram of the FRET hybridization probe of this invention. Repeatedly, it is shown by the arrow.

[Drawing 3]Drawing 3 shows the result of the Microsatellite analysis of mononucleotide repeated gene seat BAT26 of this invention.

[Drawing 4]Drawing 4 shows the result of the Microsatellite analysis of mononucleotide repeated gene seat BAT25 of this invention.

[Drawing 5]Drawing 5 shows the result of the Multiplex Microsatellite analysis of the mononucleotide repeated gene seats BAT25 and BAT26 of this invention.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to nucleic-acid-hybridization art.

[0002]

[Description of the Prior Art] In the molecular biology field, hybridization art is known well. According to this hybridization art, when a specific hybridization probe can be used, detection of specific arrangement is attained. Usually, the sign of said hybridization probe is carried out by a detectable portion, for example, radioactive labeling, fluorescent labeling, etc.

[0003] Polymerase Chain Reaction (PCR) serves as art which spread widely powerfully for the analysis of nucleic acid. The principles of PCR are a U.S. Pat. No. 4,683,195 specification and a U.S. Pat. No. 4,683,102 specification. It is indicated by [Mullis (Mullis) and others]. The main improvement points in PCR are obtained from a possibility of measuring KAINETIKKUSU of the reaction at the time of PCR by on-line detection. This is possible by detecting amplifier recon via a fluorescence monitor.

[0004] On the other hand, subsequently, in order to conduct temperature dependence melting curve analysis, the suitable fluorescent-labeling hybridization probe which already exists between amplification reactions is used for the homogeneous system assay (homogenous assay) which does not consider a reaction vessel, and it deals in it. for this analysis, the temperature of a sample is raised continuously, and the hybrid complex between target nucleic acid (amplified) and a hybridization probe produced previously measures the exact melting temperature which dissociates. In order to detect the difference in the melting temperature between the target molecules which only differ from others by a single nucleotide polymorphism, it uses and deals in this approach. That is, melting curve analysis is used also for detection or identification of point mutation, and it deals in it.

[0005] illustration of this art -- the [international publication] -- the [No. 97/46707 pamphlet and international publication] -- the [No. 97/46712 pamphlet and international publication] -- the No. 97/46714 pamphlet It is indicated in detail by [Wittwer (Wittwer) and others], and the instruction is incorporated into this specification by reference.

[0006] Some detection forms based on generating of a target dependence fluorescent signal which can monitor continuously the generation of a PCR amplification product or the identification of variation which faces the continuing melting curve analysis are indicated.

[Wittwer (Wittwer) et al., Biotechniques, the 22nd volume, No. 1, 130-138, and (1997) give an outline.] Especially as these detection forms, although not limited, the detection form based on the increase in the fluorescent resonance energy transfer in a hybridization, the detection form based on b molecule beacon, etc. are held.

[0007] In the detection form of said a, two sorts of oligonucleotide hybridization probes which can be hybridized to the field which is one chain of amplification products, and which is not overlapped although it adjoins and by which the sign was carried out in the fluorescence portion are used. Preferably, the sign of the five prime end of one oligonucleotide is carried out, and the sign of the three-dash terminal of another oligonucleotide is carried out. When hybridizing to target DNA, two fluorescent labeling is contacted to contiguity so that the fluorescent

resonance energy transfer between two fluorescence portions may happen. As a result, hybridization is monitored via excitation of a donor portion, and measurement of the firefly luminescence of acceptor portion another subsequently, and it deals in it (the [international publication] the No. 97/46714 pamphlet).

[0008] As same mode, only one fluorescent-labeling probe is used with one primer which will work also as a specific FRET pair and by which the sign was carried out appropriately. [Bernard (Bernard) et al., Anal. Biochem., 235, 101-107 (1998)] .

[0009] In the detection form of said b, the sign of the molecule beacon oligonucleotide is carried out with the fluorescent compound and optical quenching compound which are mutually close according to the secondary structure of a molecule. On the occasion of the combination to target DNA, an intramolecular hydrogen bond is destroyed and the fluorescent compound combined with one end of the probe is separated from the optical quenching compound combined with the end of the opposite hand of this probe. [RIZADI (Lizardi) et al., a U.S. Pat. No. 5,118,801 specification] .

[0010] However, before this invention was made, there was no detection form of the usable homogeneous system (homogenous) which makes possible a fixed quantity of the number of arrangement repetition in a reiterative sequence. In addition, the analysis of this number of replications is [in / for example, / the field of Microsatellite analysis] still important.

[0011] A Microsatellite (MIS) is short column arrangement which is scattered in all the human genomes. A Microsatellite is found out once [about] every 100,000 base pairs statistically. MIS of five classes which will be different from others by the length of the shortest repeating unit by the present as a mononucleotide repeat, a dinucleotide repeat, a trinucleotide repeat, a tetranucleotide repeat, or a penta nucleotide repeat is described. Usually, these repeating units happen in column arrangement repeatedly 10 to 40 times. When normal DNA of the same individual is compared with DNA of tumor material origin, in many tumor patients, the microsatellite instability (MIN) in small deletion or the form of insertion is detected, and it gets. [CHIBODO et al. (Thibodeau), Science, the 260, 816-819 (1993); international publication 94th/No. 19492 pamphlet] . This is attained by amplifying DNA by PCR and subsequently separating amplification products by gel electrophoresis. It is considered that the deficits of the permanent duplicate of tumor cells caused MIN. [Parsons (Parsons) et al., Cell, 75, 1227-1236 (1993); Shibata (Shibata) et al., Nat. Genet., 6, 273-281 (1994)] . This tumor is classified as a "duplicate error positivity" (RER+). The quality of RER+ phenotype is peculiar to the colorectal cancer of the family of HNPCC (non-[hereditary] polyp nature colon cancer; hereditary non-polyposis colon cancer). [R TONEN et al. (Aaltonen), Science, 260, 812-816 (1993)] .

[0012] The analysis of a Microsatellite is a very interesting method for [for a diagnostic use] the judgment of the tumorigenesis of a RER+ tumor. Since it is easy to determine MIN before carrying out a sequence, the mismatch repair gene of a HNPCC family is help suitable for identifying a potential RER+ patient. Since generating of MIN relates to a better prognosis, MIN analysis is important for the prognosis of sporadicness colon cancer. [Rothe et al. (Lothe), Cancer Res., 53, 5849-5852 (1993); CHIBODO et al. (Thibodeau), Science, 260, 816-819 (1993); BABBU et al. (Bubb), Oncogene, 12, 2641-2649 (1996)] .

[0013] MIN is only produced by 10 to 20% of frequency in sporadicness colon cancer. [CHIBODO et al. (Thibodeau), Science, 260, 816-819 (1993); IONOFU et al. (Ionov), Nature, 363, 558-561 (1993); R TONEN et al. (Aaltonen), Science, 260, 812-816 (1993); in the case exceeding 90% of all the HNPCC tumors, Rothe et al. (Lothe), Cancer Res., 53, and 5849-5852 (1993)] are detected, and get. [RIU (Liu) et al., Nature Med., 2, 169-174 (1996)] . However, it is not limited to colon cancer, but is detected also in other cancers, and MIN is a pancreatic cancer especially. [Alder (Han) et al., Cancer Res., 53, 5087-5089 (1993)] Gastric cancer [Alder (Han) et al., Cancer Res., 53, 5087-5089 (1993); PERUTOMAKI (Peltomaki) et al., Cancer Res., 53, 5853-5855 (1993); MIRONOFU et al. (Mironov) and Cancer. Res., 54, 41-44 (1994); Lieu et al. (Rhyu), Oncogene, 9, 29-32 (1994); jon (Chong) et al., Cancer Res., 54, 4595-4597 (1994)] Testis cancer [Gao (Gao) et al., Oncogene, 9, 2999-3003 (1994)] Endometrioma [Rye gingers (Risinger), Cancer Res., 53, 5100-5103 (1993); PERUTOMAKI (Peltomaki) et al., Cancer Res., 53, 5853-5855 (1993)] Breast cancer [PETERU (Patel) et al., Oncogene, 9, 3695-3700 (1994)] **** is mentioned.

[0014]Conventionally, as for the analysis of the Microsatellite, in order to detect the size of amplification products and for this to acquire the information about the length of a repeating structure, the fragment separation by the gel electrophoresis of what kind of case had also taken time.

[0015]Therefore, in the technical field concerned, to provide the method of analyzing the length of a repeating structure is desired, without carrying out fragment separation. It is required that this method can be performed promptly and simple. It is advantageous, when it automates theoretically and the method of starting gets.

[0016]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]An object of this invention is to provide the method of analyzing the length of a repeating structure, without carrying out fragment separation. An object of this invention is to provide the method of analyzing the length of a repeating structure, promptly and simple, without carrying out fragment separation.

[0017]

[Means for Solving the Problem]This invention relates to a way melting temperature analysis determines the number of reiterative sequences which exist in a sample.

[0018]Therefore, in the 1st concept this invention, a) At least one sort of polynucleotide hybridization probes containing the 1st segment complementary to ** non repetitive region, and the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary to an adjacent repetitive region, and was defined, ** A step which performs hybridization with target nucleic acid in a sample, And it is related with an analyzing method of target nucleic acid containing a step which determines melting point temperature of a hybrid by which b target nucleic acid and this few **** were formed among one sort of hybridization probes which consists of a reiterative sequence and a unique sequence.

[0019]According to this invention, melting point temperature may be correlated with the number of repetition which exists in target nucleic acid.

[0020]Usually, it is advantageous to compare a determined melting temperature value with a melting temperature value obtained about reference nucleic acid. Therefore, the 1st segment complementary to a** non repetitive region in this invention, At least one sort of polynucleotide hybridization probes containing the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary and was provided in an adjacent repetitive region, ** The same polynucleotide hybridization probe as a step which performs hybridization with target nucleic acid in a sample, and the b step a, In a step and c sample which make target nucleic acid in a reference sample hybridize, and a reference sample, A step which determines melting point temperature of a hybrid formed between target nucleic acid and at least one sort of hybridization probes, And it is related with an analyzing method of target nucleic acid which consists of a reiterative sequence and a unique sequence in a sample containing a step which determines a difference in melting point temperature in each of said sample and a reference sample as a standard of a difference in the number of replications between target nucleic acid in d sample, and target nucleic acid in a reference sample.

[0021]In order to make sensitivity increase, when amplifying target nucleic acid, it turns out that it is advantageous before hybridization. Amplification is easily attained by polymerase chain reaction and it deals in it, for example.

[0022]Usually, the sign of at least one sort of hybridization probes is carried out. Here, a sign is the fluorophore (fluorophore) preferably. Detection principles by FRET/Hybprobe are performed in a still more desirable mode. In this case, when both probes are hybridized by target nucleic acid, Hybridization is performed using two probes by which the sign was carried out and which are hybridized in contiguity by different fluorophore that fluorescent resonance energy transfer (Flourescence Resonance Energy Transfer) may happen.

[0023]It is applicable to an experimental design from which many as which the number of repeating structures [in / in a new method / a reiterative sequence] needs to be determined differ.

[0024]As a result, a specific concept of this invention is related with application of a new analyzing method of a Microsatellite, especially microsatellite instability (Microsatellite

Instability;MIN). In order to detect a hereditary tumor and colon cancer especially caused by deficit of a HNPCC mismatch repair gene, this analysis is applied well and it deals in it.

[0025]Similarly, it is focused on use for identification of an individual [in / for solution of a legal medicine problem / for example / in other concepts of this invention / a group of a new method of this invention].

[0026]In further concept, this invention relates to each polynucleotide hybridization probe containing the 1st segment complementary to a non repetitive region, and the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary and was provided in an adjacent repetitive region further. In a specific mode of this invention, the number of repetition which exists in a probe is the same as the number of repetition in a target sequence of a wild type. When there is no specific wild type, the number of repetition in a probe is preferably [as the maximum number of repetition found out by repeated gene seat of a subject of search] the same.

[0027]This invention is understood that a non-repeating segment of this hybridization probe is greatly advantageous when it is 3, 4, 5, or 6 nucleotide length still more preferably, 3-10 nucleotide length and.

[0028]In other concepts, the 1st probe consists of aperiodic arrangement and this invention relates to a pair of a FRET hybridization probe with which the 2nd probe contains an aperiodic field and the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary and was provided in an adjacent repetitive region.

[0029]In further concept, this invention, Above. It is related with a specific polynucleotide hybridization probe which has the arrangement of array number:7 for analysis of specific polynucleotide hybridization probe and BAT25 which has the arrangement of array number:4 for analysis of BAT26 according to the indicated probe characteristic.

[0030]Namely, this invention, [1]a) At least one sort of polynucleotide hybridization probes containing the 1st segment complementary to ** non repetitive region, and the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary to an adjacent repetitive region, and was defined, ** An analyzing method of target nucleic acid containing a step which determines melting point temperature of a hybrid in which step; which performs hybridization with target nucleic acid in a sample and b this target nucleic acid, and this few **** were formed among one sort of hybridization probes which consists of a reiterative sequence and a unique sequence, [2] The above which melting point temperature correlates with the number of repetition which exists in target nucleic acid [1]A method of a statement, [3]a) At least one sort of polynucleotide hybridization probes containing the 1st segment complementary to ** non repetitive region, and the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary to an adjacent repetitive region, and was defined, ** The same polynucleotide hybridization probe as a step which performs hybridization with target nucleic acid in a sample, and the b step a, In a step and c sample which make target nucleic acid in a reference sample hybridize, and a reference sample, A step which determines melting point temperature of a hybrid formed between target nucleic acid and at least one sort of hybridization probes, And an analyzing method of target nucleic acid which consists of a reiterative sequence and a unique sequence in a sample containing a step which determines a difference between the two aforementioned melting point temperature as a standard of a difference in the number of replications between target nucleic acid in d sample, and target nucleic acid in a reference sample, [4]The above which amplifies target nucleic acid before hybridization [1]-[3]A method given in any 1 paragraph, [5]The above which at least one sort of hybridization probes are probes by which the sign was carried out, a sign is preferred and is fluorophore [1]-[4]A method given in any 1 paragraph, [6]The above from which hybridization is performed using two sorts by which the sign was carried out by different fluorophore, respectively of probes adjoined and hybridized, and fluorescent resonance energy transfer may arise here when both probes are hybridized by target nucleic acid [5]A method of a statement, [7]The above in which fluorophore of a probe containing a non repetitive region and the 2nd segment complementary to an adjacent repetitive region is combined with a non repetitive region of a probe [6]A method of a statement,[8]The above for analysis of a Microsatellite, especially microsatellite instability [1]-[7]Use of a method given in any 1

paragraph, [9]The above as a means of detection of a hereditary tumor [8]Use of a statement, [10]The above for identification of an individual in a group [1]–[7]Use of a method given in any 1 paragraph, [11]A polynucleotide hybridization probe containing the 1st segment complementary to a non repetitive region, and the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary and was provided in an adjacent repetitive region, [12]The same above as the maximum number of repetition which exists in a repeated gene seat that the number of repetition is the same as the number of repetition of a target sequence of a wild type, or specific [11]A hybridization probe of a statement, [13]The length of a non-repeating segment is 3 – 10 nucleotide length and the above which is 4 – 6 nucleotide length preferably. [11]or[12]A hybridization probe of a statement, [14]The 1st probe is a probe hybridized to a non repetitive region, and the 2nd probe describes above. [11]–[13]A pair of a FRET hybridization probe which is a probe given in any 1 paragraph, [15]The above in which a sign of the 2nd probe is combined with a non repetitive region of this probe [14]In a pair of a FRET hybridization probe of a statement, and a row [16]array number: — 4 or array number: — it is related, without a polynucleotide hybridization probe which has the arrangement of seven.

[0031]

[Embodiment of the Invention]In this specification, the following term needs to be defined further.

[0032]On this specification and [“repeatedly”], it is the longer fragment or the short nucleic acid sequence sometimes found out also in an RNA molecule repeatedly of DNA. A nucleotide base exists [one / repeatedly] in the always same turn. It is often found out by selfish and the non-coding region of a genome repeatedly [these]. In many cases, these repeating structures are called a Microsatellite.

[0033]The number of the nucleotides produced [one] repeatedly may change. Repeatedly [mononucleotide], it consists of one kind of nucleotide base, i.e., A, G, C, or T, and the stretch of mononucleotide is brought about. A dinucleotide repeat consists of a nucleotide base of two types, for example, CA etc., and brings about mutual arrangement, i.e., the stretch of (CA) n . Also repeatedly [3 nucleotide repetition 4 nucleotide repetition, and 5 nucleotide], it is often observed. in this specification, it is understood repeatedly [n -nucleotide] that it is a repeating structure which has length n (n — 1–10 — desirable — 1–5 — they are 1 or 2 nucleotides most preferably) and which is contained repeatedly.

[0034]A reiterative sequence is arrangement which exists in the continuous arrangement or opposite direction arrangement and which it has repeatedly [two or more]. In a certain case, the reiterative sequence may be interrupted by the characteristic (unique) unique sequence. The reiterative sequence included repeatedly [mononucleotide / of repetition of two or more types, especially two or more types] is identified.

[0035]Hybridization probes are the arrangement of target nucleic acid, and polynucleotide which has complementary arrangement identically or strictly thoroughly. It is contained in the range of this invention, if this probe can hybridize under a relevant hybridization condition at an analysis target subject when said probe contains 1 or two or more mismatches. When sequence identity or complementarity is 100% over the range of at least ten adjoining residue, it turns out especially that what kind of case is advantageous. When 100 or less nucleotides of the length of a probe are 40 or less nucleotides preferably, it turns out that it is advantageous.

[0036]However, especially in this specification, a hybridization probe may have 5' projection part or three projection parts which are not hybridized to target nucleic acid. That is, since this invention relates to the method of detecting the number of repetition which exists in target nucleic acid, it needs that the number of repetition in a probe is the same as that of the maximum number of repetition in which it is expected by target nucleic acid and deals.

[0037]A hybridization probe may combine a detectable portion (entity), for example, a fluorescent compound etc., so that the result of hybridization can be detected by a publicly known method to the technical field concerned.

[0038]A “FRET hybridization probe”, When both probes adjoin a target molecule and hybridize, it works as [both] a FRET pair and, thereby, defines as a pair of a hybridization probe which carries out possible [of the detection of nucleic acid] and which holds a fluorescent compound,

respectively.

[0039] "Polynucleotide" not only in (deoxy)-oligo ribonucleotide, All the DNA derivatives or a RNA derivative publicly known to the technical field concerned, for example, methyl phosphonate,; it is summarized by the analog containing modified bases, such as a phospho thioate; 2'-O-alkyl derivative and a peptide-nucleic-acid; 7-deaza purine, etc.

[0040] According to this invention, a decision of melting point temperature is made after the hybridization of a hybridization probe and target nucleic acid. It depends for melting point temperature with the priority to the size of 2 chain field of a target / probe hybrid. When using the hybridization probe containing a reiterative sequence, hybridization temperature may be correlated depending on the number of repetition which exists in target DNA.

[0041] As for a melting temperature, it is publicly known to the technical field concerned to depend without other factors with comparatively low importance, such as GC content of ** double stranded region, existence of the mismatch in ** double stranded region, and **, for example, the salt concentration of a sample, etc., and it should not be disregarded.

[0042] Melting point temperature is experimentally determined by presenting the compositional rise of temperature with a sample, then usually measuring the dissociation to the single strand of a hybridization complex. Dissociation is detected by the shift of UV absorption, surface plasmon resonance, or desirable various methods, such as fluorescence, and it deals in it, for example. When detected by fluorescence, the sign of the hybridization probe is usually carried out in a fluorescence portion, and it depends for generation of a fluorescent signal on formation of a hybridization complex in a certain form. In this specification, the rise of temperature which is linear as for the compositional rise of temperature, and is not interrupted is said.

[0043] Assay is performed by the detection form of a homogeneous system in a desirable mode. For example, target nucleic acid may be amplified at the reaction of typical PCR by a suitable amplification primer in advance of melting temperature determination. A suitable hybridization probe already exists in the case of an amplification reaction. A hybridization probe supports fluorescent labeling preferably detectable after suitable excitation. For example, a hybridization probe is a molecule beacon preferably. [RIZADI (Lizardi) et al., a U.S. Pat. No. 5,118,801 specification] Or a FRET-Hybprobe form They may be a pair of any of the oligonucleotide which can work according to [both] [the international publication 97th/No. 46714 specification] and which was labeled fluorescently. The temperature of a sample is compositionally raised after the ending reaction of PCR. If a hybridization probe is combined with target DNA, fluorescence will be detected and it will get. However, at a melting temperature, a hybridization probe dissociates from the target and fluorescent signals decrease in number promptly even on a background level. This reduction is monitored in a suitable temperature-time plot so that the exact temperature value with which a temperature fall is observed can be determined.

[0044] Some preconditions are required of the design of the hybridization probe of this invention.

[0045] The probe must contain [1st] the non-repeating hybridization segment which carries out localization to either the five prime end of this probe, or a three-dash terminal. The length of a non-repeating segment may change depending on specific assay conditions. Usually, the segment of at least 3 nucleotides hybridized to a target sequence comes out enough, and a certain thing is understood. Existence of this non-repeating hybridization arrangement has the strong point unrelated to the number of the same repetition in a target sequence, and the probe will be correctly hybridized in the position the target nucleic acid which is the transition between the fields which always consist of a non repetitive region and a reiterative sequence was decided to be.

[0046] The number of repetition which exists in the probe which exists [2nd] in the arrangement of target nucleic acid, and which is extended repeatedly is dramatically important. The hybridization probe more specifically included repeatedly [n / which was used for the method of this invention] could identify between some target nucleic acid included repeatedly [of the number between 0-n]. By contrast, probably, the determined melting point temperature will be equal to all the target nucleic acid included a number exceeding n repetition or n of repeatedly.

[0047] The number of repetition which exists in a hybridization probe the 3rd is limited by the fact that the length of the hybridization probe by which it is used for melting point temperature

analysis and in which it deals is limited. In this specification, it turns out that 80 or less nucleotides have it preferably 100 or less nucleotides when the length of the whole hybridization probe is 60 or less nucleotides. [advantageous]

[0048]Drawing 1 shows two different probe designs which may be used when applying one hybridization probe. This may be what kind of uneven assay form, and may be a case to which a fluorescence portion joins together or approaches either the five prime end of a probe, or a three-dash terminal, and an optical quenching portion joins together or approaches the reverse end of a probe where the molecule beacon form of a homogeneous system is used independently.

[0049]in a certain case, the probe of this invention consists of two non-repeating segments, a five prime end and a three-dash terminal, connected by the internal repetitive segment -- **** -- it is good.

[0050]A probe contains a complementary non-repeating portion to the field non-repeating (unique) in the target sequence which adjoins directly the repetitive field in the five prime end or three-dash terminal, and carries out localization. In the case as a result of hybridization with the target molecule included repeatedly [less than a hybridization probe], the number of repetition in a hybridization probe and the number of repetition in a target sequence compare with an equal state, The single strand projection part of a probe arises and a melting temperature decreases. More generally, a melting temperature is directly dependent on the number of repetition which exists in a target, i.e., as it exists by a sample many repeatedly, a melting temperature becomes still higher.

[0051]Although drawing 2 shows three different FRET Hybprobe designs, it does not limit the range of this invention. About this probe design, since a certain probe is interrupted as soon as, as for a FRET process, it dissociates from a target molecule, the 2nd probe containing a repetitive field needs to have a higher melting temperature as compared with the melting temperature of the probe which does not include a reiterative sequence.

[0052]Drawing 2 A indicates the pair of the hybridization probe with which the 1st hybridization probe consists of a unique sequence monopolistically complementary to the field of the upper stream in contact with contiguity of the repetitive field of an analytical object. Fluorescent labeling is added to the three-dash terminal of a probe. The 2nd probe is designed by this invention and has the 1st arrangement complementary to a unique sequence, and the 2nd arrangement complementary to the reiterative sequence of target nucleic acid. When holding fluorescent labeling in that five prime end and hybridizing both probes to a target molecule, this probe approaches the sign of the 1st probe and contacts.

[0053]Although the probe which consists of unique sequences monopolistically on the other hand holds a sign to the five prime end and hybridizes downstream from a repetitive field, the mode to which the sign of the 2nd probe designed by this invention is carried out in the three-dash terminal is also within the limits of this invention.

[0054]Drawing 2 B shows another approach of the probe design of this invention. Here, fluorescent labeling of a probe including both a reiterative sequence and a unique sequence is added to the repetitive segment of a probe. The loop will be produced in this probe so that a melting temperature may decrease, when it is hybridization with target molecules repeatedly fewer than a complementary hybridization probe.

[0055]The hybridization probe of two pairs designed by this invention can also be used. In the case of the melting temperature analysis following the result of hybridization, two remarkable melting temperatures are observed, subsequently to a target, the number of existing repetition is computed in consideration of the melting temperature as which both were determined, and it gets.

[0056]Drawing 2 C indicates the further exception method within the limits of this invention. Both probes contain the 1st segment complementary to a non repetitive region, and the 2nd segment that becomes a number of repeatedly which is complementary and was provided in the adjacent repetitive region. Subsequently, two fluorescent labeling is added in two repetitive fields of a probe. In this specific case, both the number of repetition which exists in both probes corresponds to the maximum number of repetition which is probably expected from the target

nucleic acid of an analytical object. Repeatedly it exists in target nucleic acid, when less, loop structure is formed in a hybridization probe and a melting temperature falls.

[0057] Since two probes hybridized to a reiterative sequence are used, further, Since the maximum length of an oligonucleotide hybridization probe is limited by the capability of a conventional oligonucleotide synthetic chemistry method, this mode of this invention is useful to especially the analysis of a very long repeating structure. However, when the target repeated gene seat and the locus of a different genome from it become repeatedly [same type], these probes, This probe design will bring about reduction in singularity, in order to combine with both the loci of a different genome from the target repeated gene seat.

[0058] This invention is suitable for the analysis of a reiterative sequence, and a use especially various [for the analysis of Microsatellite repetition]. For example, it is applied to the Microsatellite repetition analysis of this invention evaluating the deficit of heterozygosity, then making it into the index of the tumor of some types as an index of the genome instability of an antioncogene, and gets. [Knudson (Knudson), Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 90, 10914 – 10921 pages (1993)] .

[0059] Microsatellite instability by which especially a new invention is an index of the variation in a mismatch repair gene, therefore becoming an index of non-[hereditary] polyp nature colon cancer (HNPCC) is known It is applied to the analysis of [PERUTOMAKI (Peltomaki) et al., 260,810 – 812 pages (1993) of Science(s)], and gets. For example, the cancer of other types, such as small cell lung cancer, can also be diagnosed in advance.

[0060] All types of the group research and the legal medicine use in which this invention finally includes individual recognition, organization typing, and a group gene analysis Generally it is applicable to [Kes et al. (Koeth), J.Path., and 178,239 – 248 pages (1996)].

[0061]

[Example] It is provided in order that the following examples, references, array tables, and drawings may help an understanding of this invention, and the original range is shown in an attached claim. Change accomplishing in the shown procedure and getting is understood without deviating from the intention of this invention.

[0062] Example 1 the Microsatellite stability (MSS) tumor of sample material and preparation 70 case, and the Microsatellite unstable MSI-H tumor (a $\geq 20\%$ instability marker, high MSI) of eight cases, It used for the LightCycler Microsatellite melting point analysis by the mononucleotide repeated gene seats BAT25 and BAT26. These markers are described as high sensitivity marker of MSI detection. [Joan (Hoang) et al., Cancer Res., (1997) DETTOMA years (Dietmaier), Cancer Res., (1997) Claveau (Cravo) et al., J.Pathol (1999)] .Because of LightCycler analysis, it is a laser support micro DISE cushion from the 5-micrometer section of formalin fixation paraffin embedding tissue. [The product made by PALM, burn RIETO, Germany] Or with the manual micro DISE cushion, the MIKURODI sect of a tumor tissue field and the normal tissue field was carried out. DNA of the organization origin which carried out the MIKURODI sect was prepared by High Pure PCR Preparation Kit (made in Roche).

[0063] Real-time PCR 2microl DNA (50 – 200ng) of example 2 BAT26, Last concentration 3mM $MgCl_2$, The BAT26-Upstream amplification primer (array number: 1;tgacta ctt ttg act tca gcc) and BAT26-Downstream amplification primer (2;aac cat array number:.) of 0.5microeach M tca aca ttt tta acc, the 0.15microM BAT26-donor hybridization probe which carried out the sign of the three-dash terminal by fluorescein (array number: 3;gca gca gtc aga gcc ctt aac ct), A five prime end. LightCycler fluorescent. It is a 0.15microM BAT26-acceptor hybridization probe (4;tca ggt aaa aaa aaa array number:.) at dye LC-Red-640 (made by Roche Molecular Biochemicals). It mixed with the amplification mixture of 13microl which brings about aaa aaa aaa aaa aa and 1xLightCyclerTM DNA Master Hybridization Probes-Mix (made by Roche Molecular Biochemicals).

[0064] LightCycler (made by Roche Molecular Biochemicals) was used for the monitor of the continuing real-time PCR amplification. The BAT26 PCR-amplification program was started at 1 time of a denaturation step in 95 ** 90 seconds, for signal detection, 95 **/0 second – 60 **/10 seconds – 50 **/50 cycles of 3 seconds were performed, and, subsequently 72 **/10 seconds

were performed. Then, the fusion profile was performed by raising temperature to every 0.2 **/second 95 **, having incubated amplifier recon in 35 **/30 seconds, and carrying out pipe F2 continuous detection for 95 **/0 second.

[0065]The amplification, detection, and melting point analysis of BAT26 by real-time PCR can be performed in each of 26 / 125/153 (82%) and 31 (83%) formalin-fixation paraffin embedding tissue sample. BAT26 melting-point analysis expressed a 51 – 51.8 ** melting temperature (Tm) about normal tissue, blood, or an MSS tumor (drawing 3 A). By contrast, each of seven sorts of MSI-H tumors and the MSI rate of 100% which suffer a loss in a hMSH2 protein manifestation or a hMLH1 protein manifestation showed that Tm value changed in 43–46 ** (drawing 3 B).

[0066]Except for that by which real-time PCR ** of example 3 BAT25 was carried out, amplification and melting curve analysis were conducted like Example 2.

[0067]The BAT25–Upstream primer (array number: 5;tcg cct cca aga atg taa gt) and BAT25–Downstream primer (array number: 6;tct gca ttt taa cta tgg ctc) of 0.5microeach M, The 0.15microM BAT25–donor hybridization probe which carried out the sign of the three-dash terminal by fluorescein (array number: 7;caa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aat ca), A five prime end. LightCycler fluorescent. The 0.15microM BAT25–acceptor hybridization probe (array number: 8;aacaaa acacaa aac tct tta gag aat c) which carried out the sign by dye LC–Red–705 (made by Roche Molecular Biochemicals), It used for BAT25 LightCycler amplification.

[0068]The BAT25 amplification program contained 95 **/0 second – 60 **/50 cycles of 10 seconds and 72 **/10 seconds for 1 time of the 95 ** denaturation step for 90 seconds, and signal detection. For 95 **/0 second, amplifier recon was incubated in 35 **/30 seconds, and the fusion profile was performed by raising temperature to every 0.2 ** /95 ** a second, carrying out F3 continuous detection. A result is shown in drawing 4. setting the melting point analysis of BAT25 to normal tissue and MSS tumor DNA — Tm value of 44.5 ** -- having been shown (drawing 4 A) — the BAT25–Tm value of two MSI–H tumors was 42 ** low intentionally (drawing 4 B).

[0069]About duplex PCR for analyzing BAT25 and BAT26 within the tube of one real-time duplex PCR of example 4 BAT26 and BAT25, The primer and the FRET–hybridization probe of both BAT25 and BAT26 of array number:1 – 8 were doubled by the concentration shown in Examples 2 and 3.

[0070]95 **/0 second – 60 **/10 seconds – 45 **/50 cycles of 2 seconds and 72 **/10 seconds for 1 time of :95 ** denaturation step for 90 seconds which is as follows [program / LightCycler amplification], and signal detection. Duplex melting–curve program,: It was a rise in heat up to every 0.2 **/second 95 ** for 95 **/0 second using 30 **/30 seconds, and the continuous fluorescence detection in F2 and F3.

[0071]When duplex LightCycler amplification of BAT25 and BAT26 was performed, higher Tm value was obtained compared with another LightCycler analysis of BAT25 and BAT26 (drawing 5). The difference in Tm was 4 ** about BAT25 (drawing 5 A). Tm value of BAT26 was high 1 ** (drawing 5 B).

[0072]

[Table 1]

参考文献のリスト

- Aaltonen ら、(1993), Science, 260, 812-816
 Bernard ら、Analytical Biochemistry 235, p. 101-107 (1998)
 Bubb ら、(1996) Oncogene, 12, 2641-2649
 Chong ら、(1994) Cancer Res., 54, 4595-4597
 Cravo ら、1999, J Pathol
 Dietmaier ら、1997, Cancer Res.
 Gao ら、(1994) Oncogene, 9, 2999-3003
 Han ら、(1993) Cancer Res., 53, 5087-5089
 Hoang ら、1997, Cancer Res.
 Ionov ら、(1993), Nature, 363, 558-561
 Knudson, Proc. Natl. Acad. Sci. US 90, p 10914-10921, 1993
 Koeth ら、J. of Path. 178, p. 239-248, 1996
 Liu ら、(1996) Nature Med., 2, 169-174
 Lizardi ら、米国特許第 5, 118,801 号明細書
 Lothe ら、(1993) Cancer Res., 53, 5849-5852
 Mironov ら、(1994) Cancer Res., 54, 41-44
 Parsons ら、(1993), Cell, 75, 1227-1236
 Patel ら、(1994) Oncogene, 9, 3695-3700
 Peltomaki ら、(1993) Cancer Res., 53, 5853-5855
 Peltomaki ら、Science 260, p 810-812, 1993
 Rhyu ら、(1994) Oncogene, 9, 29-32
 Risinger ら、(1993) Cancer Res., 53, 5100-5103
 Shibata ら、(1994) Nat. Genet. 6, 273-281
 Thibodeau ら、(1993) Science, 260, 816-819
 Wittwer ら、Biotechniques, Vol. 22, No. 1, 130-138, 1997

[0073]

[Effect of the Invention] According to the analyzing method of the target nucleic acid which consists of the reiterative sequence and unique sequence of this invention, the outstanding effect that target nucleic acid is analyzable promptly and simple is done so, without performing fragment separation by gel electrophoresis. According to the polynucleotide hybridization probe of this invention, the outstanding effect that the analysis of a very long repeating structure is attained is done so.

[0074]

[Layout Table]

SEQUENCE LISTING<110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG<120> Method for melting curve analysis of repetitive PCR products< 130> ROC-01-009<150> EP 00 124 897.0 <151> 2000-11-15<160> 8 <170> PatentIn Ver.2.1 <210> 1 <211> 21<212> DNA <213> Homo sapiens<400> 1 tgactacttt tgacttcagc c 21[0075]
 <210> 2 <211> 21<212> DNA <213> Homo sapiens<400> 2 aaccattcaa catttttaac c 21[0076]
 <210> 3 <211> 23<212> DNA <213> Homo sapiens<400> 3 gcagcagtca gagcccttaa cct 23[0077]
 <210> 4 <211> 30<212> DNA <213> Homo sapiens<400> 4 tcaggtataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa 30[0078]
 <210> 5 <211> 20<212> DNA <213> Homo sapiens<400> 5 tcgcctccaa gaatgtaagt 20[0079]
 <210> 6 <211> 21<212> DNA <213> Homo sapiens<400> 6 tctgcatttt aactatggct c 21[0080]
 <210> 7 <211> 29<212> DNA <213> Homo sapiens<400> 7 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaatca 29 [0081]
 <210> 8 <211> 28<212> DNA <213> Homo sapiens<400> 8 aacaaaacac aaaactcttt agagaatc 28

[Translation done.]